

# 微生物甾醇侧链发酵生产甾体药物中间体的研究进展

杨顺楷

中国科学院成都生物研究所  
二〇一一年十二月22-23日 上海 世博

## 关键词

- 植物甾醇
- 微生物转化/选择性降解
- 甾体药物中间体

## 引言

## 引言

- 全球市场/半合成路线/薯蓣皂素6000t/a
- 半合成原料分布格局
  - 薯蓣皂素 (Diosgenin) 55%
  - 谷甾醇 (Sitosterol) 15%
  - 胆固醇类 (Cholesterols) 10%
  - 蕃麻皂素 (Hecogenin) 10%
  - 其他 10%
- 甾体激素药物市场的成长性/原料多元化
- 我国甾体药业的研发现状及发展前景

## 全球甾体激素药物市场拓展历程

年代	产量 (t/a)	销售额 (亿美元)	占医药产品销售总额 (%)
1980	9.5	15.0	4.3
1990	105	108	年均递增10.4%
2000	400	200	6

## 引言

据统计,自80年代初以来,世界甾体药物总产量及销售额以年14%~15%的速度增长。此增长率不低于抗生素感染药物、心血管药物、中枢神经系统药物和解热镇痛药物。当前,国外的主要甾体药物生产国是美国、欧洲和日本。我国是甾体药物生产大国,但并不是强国。

## 原 理

## 原 理

- 动物甾醇：胆固醇
- 植物甾醇：主要为 $\beta$ -谷甾醇，豆甾醇，菜油甾醇三组分混合物
- 微生物选择性断17-烷基侧链

## 植物甾醇资源化学组成比较

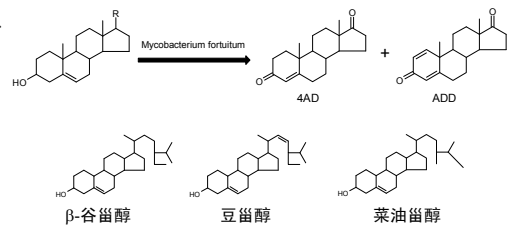
名 称	$\beta$ -谷甾醇	菜油甾醇	豆甾醇	菜籽甾醇
大 豆	40%	25%	25%	—
油 菜	45%	35%	—	12%
松 杉	70%	10%	15%	—

## 选择性断17-烷基侧链

①化学手段的不可行性，豆甾醇例外

②细菌生物降解选择性断侧链

所以



## 研 究 进 展

## 国外研究进展

1968年

SIH et al. 提出微生物甾醇断侧链经由脂肪酸 $\beta$ -氧化类似的机理，止于 $C_{17}$ -酮甾体化合物

- A环的氧化：3 $\beta$ -羟-5-烯键成为3-酮-4-烯化合物 (1961)
- A环 $\Delta^{1,2}$ -脱氢：ADD的生成 (1963)
- 9 $\alpha$ -羟化-AD (1964)

## 国外研究进展

### 1978年细菌突变株的选育

- 分枝杆菌 (*Mycobacterium fortuitum*) ATCC 6842, 野生型可将β-甾醇快速代谢为CO<sub>2</sub>和水, 它易于在含甘油或17-甾甾体作唯一碳源及能源的基本培养基上生长
  - *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119, 突变株大量细胞群体中诱变筛选, 分离获得; 生长培养特征: 对照平板生长/但在含17-甾甾体的平板生长很慢或不生长
  - *Mycobacterium fortuitum* -病原菌 (1975)
- ∴ 重新又从*Mycobacterium sp.* NRRL B-3805选出*Mycobacterium vaccae*

## 国外研究进展

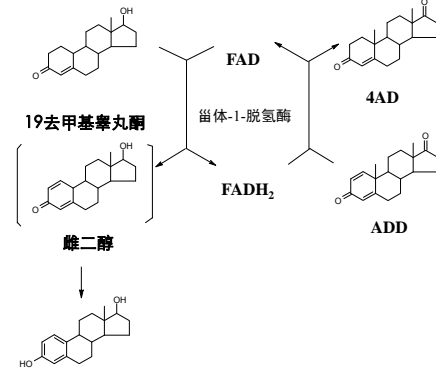
### 80年代以来

生物降解甾醇产ADD, 4AD, 9α-OH-4AD  
 技术得到充分发展, 实现全球千吨级年产量  
 例如: 德国先令公司4AD/ADD生产规模已达发酵罐200M<sup>3</sup>

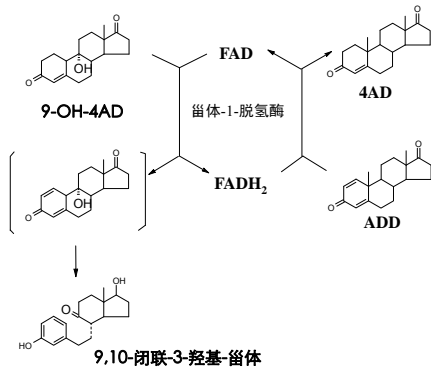
## 国内研究进展

- 早期: 1970年代, 中国科学院微生物所/上海有机化学所
- 中期: 1987年, “七五” 攻关, 增加上海医药学院、南京药学院, 本实验室自选作了部分工作
- 近期: 以保定加合生物化学有限公司实现发酵降解植物甾醇为4AD, 并结合霉菌氧化制11α-OH-AD, 为化学法引入C17侧链制C21-甾体提供有用化学结构。

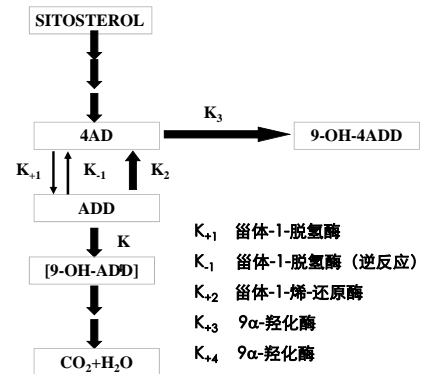
## 甾体-1-脱氢酶的双底物反应



## 甾体-1-脱氢酶的双底物反应



## 甾醇降解图示

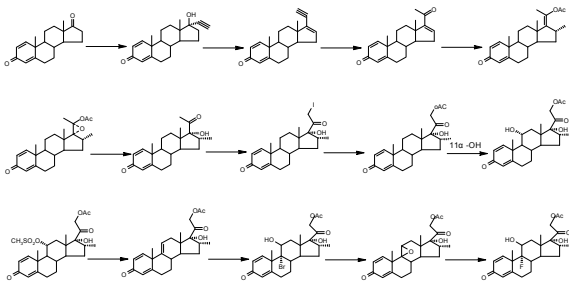


## 推 论

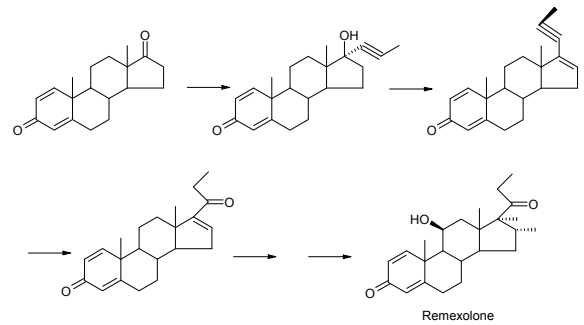
## 推 论

这是一种 $K_{+1}$ 和 $K_3$ 生成AD的竞争性反应； $K_1$ 和 $K_2$ 的反应平衡向生成AD方向移动。经由 $K_3$ 导致AD浓度的降低；由于9-OH-AD较AD有更高的亲水性，它较AD更快离开细菌细胞进入胞外水相，这就造成胞内甾体浓度的降低，反应平衡向生成AD方向移动，AD浓度的降低导致很低的ADD水平。 $K_4$ 反应因缺少底物，故经由 $K_3$ 破裂甾环的反应成为不可能。这一结果就造成微生物分枝杆菌选择性发酵降解甾醇，有效积累9-OH-AD成为了可能，避免了甾环裂解的代谢途径。

## ADD路线制备地塞米松



## ADD路线制备利美索龙



## 存 在 问 题

## 存 在 问 题

调控转化产物AD (D) 比例，尽量生成单一优势组分，避免分离

- ❑ 发酵生理水相中甾醇底物溶解度低，存在产物4AD/ADD (底物) 的抑制问题
- ❑ 添加代谢酶抑制剂发酵，及有机相介质生物转化
- ❑ 传统诱变选育技术/分子生物学手段的菌株改进问题
- ❑ 发酵参数的工艺优化问题

## 小结

微生物发酵断植物甾醇侧链生产AD, ADD, 以及9 $\alpha$ -羟基-AD甾体药物中间体的工业生物技术对改变制造甾体激素药物半合成原料薯蓣皂素短缺的现状, 实现半合成原料多元化, 合理利用我国甾体植物资源具有重要意义。

研发内容包括:

1) 微生物菌种选育, 直接筛选及从天然源分离具有生物技术用途的菌株; 2) 菌株相关的细胞生理、酶学性质及生物催化过程; 3) 发酵工艺及生物反应器选择; 4) 甾醇原料的合理利用。

## 小结

- 分枝杆菌属菌株发酵甾醇可定向断侧链有效积累4AD/ADD, 甚至9-OH-4AD,
- 有的分枝杆菌 (*Myc. vaccae*) 证实了对甾环的破坏裂解是经由A环C<sub>12</sub>脱氢后, 紧接着B环C<sub>9</sub>-的羟基化, 最后经B环破坏, 代谢降解为CO<sub>2</sub>和水
- 分枝杆菌 (*Myc. vaccae*) 突变株因 $\Delta^{1,2}$ -脱氢能力的缺失, 导致有效积累更有用的中间体9-OH-4AD
- 甾醇侧链氧化是一个具有复杂调控机制多酶体系作用过程, 发展该工业生物技术尚有许多应用基础研究工作要作, 遵循“技术可行, 经济合理”原则, 方可进行产业

谢 谢!